

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 839 087**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.11.2014 PCT/EP2014/003011**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.05.2015 WO15070972**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.11.2014 E 14823891 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.10.2020 EP 3068798**

54 Título: **Anticuerpo derivado de IGG1 humana con actividad pro-apoptótica**

30 Prioridad:

12.11.2013 US 201361902926 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:

05.07.2021

73 Titular/es:

**OGD2 PHARMA (100.0%)
3, chemin du Pressoir Chênaie
44100 Nantes, FR**

72 Inventor/es:

**DORVILLIUS, MYLÈNE;
LE DOUSSAL, JEAN-MARC y
TERME, MICKAËL**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 839 087 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo derivado de IGG1 humana con actividad pro-apoptótica

Campo de la invención

La presente invención proporciona nuevos anticuerpos y sus usos en terapias.

5 Antecedentes de la invención

Dado que los anticuerpos son moléculas de proteína que tienen alta actividad de unión y especificidad de unión a una molécula diana (antígeno) y alta estabilidad en sangre, se han intentado aplicaciones de los mismos a agentes de diagnóstico, preventivos y terapéuticos para diversas enfermedades humanas. Aunque los anticuerpos se producen generalmente administrando (inmunizando) un antígeno a un animal no humano, los anticuerpos obtenidos de un animal no humano tienen una secuencia de aminoácidos específica de la especie y los efectos secundarios se deben a que los anticuerpos son reconocidos como sustancias foráneas en el organismo humano. Por consiguiente, se han preparado anticuerpos quiméricos humanos o anticuerpos humanizados a partir de anticuerpos de animales distintos de los seres humanos (animales no humanos) utilizando técnicas de recombinación de genes.

Los anticuerpos quiméricos humanos y los anticuerpos humanizados han resuelto los problemas que poseen los anticuerpos de animales no humanos, tales como los anticuerpos de ratón, tal como la alta inmunogenicidad, la baja función efectora y la semivida breve en sangre, y las aplicaciones de anticuerpos monoclonales a las preparaciones farmacéuticas fueron posibles gracias a su utilización. En los Estados Unidos, por ejemplo, una pluralidad de anticuerpos humanizados ya ha sido sometida a prueba como anticuerpos para el tratamiento del cáncer y está en el mercado.

Estos anticuerpos quiméricos humanos y anticuerpos humanizados muestran en realidad efectos hasta cierto punto a nivel clínico, pero se demandan anticuerpos terapéuticos que tengan efectos superiores. Por ejemplo, en el caso de la administración única de Rituxan (fabricado por IDEC/Roche/Genentech), que es un anticuerpo quimérico humano contra CD20, se ha informado que su índice de respuesta para pacientes con linfoma no Hodgkin de baja malignidad recidivante en la prueba clínica en fase III no supera 48% (remisión completa 6%, remisión parcial 42%) y la duración media de su respuesta es de 12 meses. En el caso de la administración única de Herceptin (fabricado por Genentech), que es un anticuerpo humanizado contra HER2, se ha informado que su índice de respuesta para pacientes con cáncer de mama metastásico en la prueba clínica en fase III es solo de 15%, y la duración promedio de su respuesta es de 9,1 meses.

La molécula de anticuerpo humano también se denomina inmunoglobulina (en lo sucesivo, Ig) y se clasifica en subclases IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgM en función de su estructura molecular. Los cuatro isotipos de IgG humana (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) son altamente homólogos entre sí en la secuencia de aminoácidos en la región constante de la cadena H excepto por las bisagras que muestran una amplia variedad. Sin embargo, estos isotipos inducen una actividad efectora de diferente intensidad. En general, la actividad ADCC disminuye en el siguiente orden: IgG1 > IgG3 > IgG4 = IgG2, mientras que la actividad CDC disminuye en el siguiente orden: IgG3 ≥ IgG >> IgG2 ≈ IgG4.

Aunque la IgG1 humana y la IgG3 humana son subclases que tienen excelentes actividades ADCC y CDC, se sabe que el anticuerpo IgG3 humano tiene una semivida más corta en la sangre que otras subclases de IgG humana y, por tanto, desaparece rápidamente de la sangre después de la administración. También se sabe que la IgG3 humana no tiene actividad de unión a la proteína A, a diferencia de otras subclases de IgG humana. Al producir un anticuerpo a escala industrial, predomina un proceso de purificación que utiliza proteína A y otros procesos que utilizan, por ejemplo, proteína G tienen algunos problemas, tales como un alto coste de purificación.

Basándose en lo anterior, se puede decir que el anticuerpo IgG1 humano es la subclase más adecuada como fármaco de anticuerpos, ya que tiene mayores actividades ADCC y CDC que otras subclases, se puede purificar utilizando proteína A, muestra una semivida prolongada en sangre y tiene un valor desde el punto de vista del coste de producción. Aunque se ha empleado un anticuerpo IgG1 humano como fármaco en la práctica como se describió anteriormente, los efectos del fármaco mostrados por los fármacos de anticuerpos existentes son todavía insuficientes.

Por tanto, se ha requerido un fármaco de anticuerpo que tenga efectos mejorados.

Se han introducido muchas modificaciones en la secuencia de aminoácidos de la IgG1 humana intercambiando parte de ella. Sin embargo, tal anticuerpo preparado mediante el reemplazo de una secuencia de aminoácidos que no está presente en la naturaleza tiene el riesgo de que sea reconocido como una materia foránea en el organismo humano y por lo tanto induzca un efecto secundario similar al anticuerpo animal no humano como se discutió anteriormente. Por otro lado, la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo preparado intercambiando secuencias de aminoácidos entre subclases humanas es una combinación de secuencias de aminoácidos de anticuerpos inherentemente portados por seres humanos. Natsume et al. (Cancer Research, 2008, vol. 68, núm. 10, páginas 3863-3872) describen un método para mejorar la citotoxicidad dependiente del complemento de un anticuerpo mediante el uso

de una región constante modificada genéticamente de isotipos quiméricos IgG1/IgG3 humanos.

Compendio de la invención

A continuación, los autores de la presente invención han demostrado sorprendentemente que una mutación específica en CH1 γ 1 de un anticuerpo quimérico (c8B6), que restaura el emparejamiento entre los dominios CH1 y CL que es típico de otras subclases de IgG, o su sustitución por un CH1 γ 3 humano, da como resultado la restauración de la actividad pro-apoptótica del anticuerpo IgG3 8B6 murino parental, siendo dicha propiedad inherente a la mayoría de los anticuerpos IgG3.

En consecuencia, parece que el emparejamiento atípico entre la bisagra y el dominio CL en la IgG1 humana - debido a la ausencia de cisteína en el dominio CH1 - está asociado con la menor actividad pro-apoptótica observada para los anticuerpos IgG1.

En consecuencia, la presente invención se refiere a un método para aumentar la actividad pro-apoptótica de un anticuerpo de inmunoglobulina G clase 1 (IgG1) quimérico o humanizado que ha perdido su actividad pro-apoptótica en el proceso de quimerización y que se une específicamente a un antígeno gangliósido con la condición de que dicho gangliósido no corresponda a GD2-O-acetilado, comprendiendo dicho método la etapa de mutar el dominio CH1 γ 1 humano de dicho anticuerpo sustituyendo el aminoácido en la posición 133 o 134, de acuerdo con el índice EU como se establece en Kabat *et al.*, del dominio CH1 γ 1 humano de dicho anticuerpo por un resto de cisteína, para restablecer el emparejamiento entre los dominios CH1 y CL que es típico de las subclases IgG2, IgG3 e IgG4 humanas, o sustituyendo el dominio CH1 γ 1 humano de dicho anticuerpo por el dominio CH1 de una IgG2 (CH1 γ 2), IgG3 (CH1 γ 3) o IgG4 (CH1 γ 4) humanas.

El anticuerpo derivado de IgG1 obtenido mediante el método de la presente invención presenta una combinación de las propiedades inherentes de IgG1 y de una actividad pro-apoptótica aumentada que da como resultado una eficacia terapéutica potencializada.

La presente invención también se refiere a un anticuerpo, o un fragmento funcional del mismo, que se puede obtener mediante tal método, en donde dicho anticuerpo comprende:

a) una cadena ligera que comprende las siguientes secuencias de aminoácidos:

i) la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR) específica de un antígeno; y

ii) un dominio Constante (CL) kappa (κ) humano; y

b) una cadena pesada que comprende las siguientes secuencias de aminoácidos:

i) la Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR) específica de dicho antígeno;

ii) los dominios CH2 y CH3 de una IgG1 humana; y

iii) el dominio CH1 de una IgG1 humana, que está mutado para restaurar el emparejamiento entre los dominios CH1 y CL que es típico de otras subclases de IgG, o está sustituido por un dominio CH1 de una IgG2, IgG3 o IgG4 humanas.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos uno de tales anticuerpos y un portador farmacéuticamente aceptable.

Además, la presente invención se refiere a un método para tratar un cáncer que comprende proporcionar a un paciente que lo necesite una composición farmacéutica que comprenda al menos uno de dichos anticuerpos, o al menos un fragmento funcional de los mismos.

Finalmente, la presente invención se refiere al uso de al menos uno de tales anticuerpos, o de al menos un fragmento funcional de los mismos, para la preparación de un medicamento para tratar y/o prevenir el cáncer.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra las secuencias de cadena ligera y pesada del anticuerpo c8B6.

La Figura 2 muestra la secuencia de dominios CH1 y bisagra del anticuerpo 301.14a.

La Figura 3 muestra la secuencia de dominios CH1 y bisagra de los anticuerpos 301.14b y 311.14b.

La Figura 4 muestra la secuencia de dominios CH1 y bisagra de los anticuerpos 301.15 y 311.15.

La Figura 5 muestra la secuencia de dominios CH1 y bisagra del anticuerpo 301.16.

La Figura 6 muestra la secuencia de dominios CH1 y bisagra del anticuerpo 301.17.

La Figura 7 muestra la secuencia de dominios CH1 y bisagra del anticuerpo 301.18.

La Figura 8 muestra la secuencia de dominios CH1 y bisagra del anticuerpo 301.19.

La Figura 9 muestra la secuencia de dominios CH1 y bisagra del anticuerpo 301.15b.

La Figura 10 muestra la secuencia de dominios CH1 y bisagra del anticuerpo 301.20.

5 La Figura 11 muestra la secuencia de dominios CH1 y bisagra del anticuerpo 301.21.

La Figura 12 muestra la citotoxicidad directa de anticuerpos anti-OacGD2 por yoduro de propidio.

La Figura 13 muestra la citotoxicidad directa de anticuerpos anti-GD2 por yoduro de propidio.

Descripción detallada

10 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para incrementar la actividad pro-apoptótica de un anticuerpo de inmunoglobulina G de clase 1 (IgG1) quimérico o humanizado que ha perdido su actividad pro-apoptótica tras el proceso de quimerización y que se une específicamente a un antígeno gangliósido con la condición de que dicho gangliósido no corresponde a GD2-O-acetilado, comprendiendo dicho método la etapa de mutar el dominio CH1 γ 1 humano de dicho anticuerpo sustituyendo el aminoácido de la posición 133 o 134, según el índice EU expuesto en Kabat et al., del dominio CH1 γ 1 humano de dicho anticuerpo por un resto de cisteína, con el fin de restaurar el emparejamiento entre los dominios CH1 y CL que es típico de las subclases IgG2, IgG3 y IgG4 humanas, o sustituyendo el dominio CH1 γ 1 humano de dicho anticuerpo por el dominio CH1 de una IgG2 (CH1 γ 2), IgG3 (CH1 γ 3) o IgG4 (CH1 γ 4) humanas.

Dicho método de incremento de la eficacia terapéutica comprende incrementar la actividad pro-apoptótica de dicho anticuerpo.

20 Un anticuerpo es una molécula de inmunoglobulina que corresponde a un tetrámero que comprende cuatro cadenas de polipéptidos, dos cadenas pesadas (H) idénticas (aproximadamente 50-70 kDa cuando están completas) y dos cadenas ligeras (L) idénticas (aproximadamente 25 kDa cuando están completas) interconectadas por medio de enlaces disulfuro. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa y lambda.

25 La cadena pesada se clasifica como gamma para la IgG. Cada cadena pesada está formada por una región variable de cadena pesada N-terminal (abreviada como HCVR) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está formada por tres dominios (CH1, CH2, y CH3) para IgG y un dominio bisagra entre los dominios CH1 y CH2.

30 Cada cadena ligera está formada por una región variable de cadena ligera N-terminal (abreviada en la presente memoria como LCVR) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está formada por un dominio, CL. Las regiones HCVR y LCVR se pueden subdividir adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada HCVR y LCVR está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio se realiza de acuerdo con convenciones bien conocidas (IMGT, The International Immunogenetics Information System®, LEFRANC et al., Nucleic Acids Research, vol. 27, pág.: 209-212, 1999). La capacidad funcional del anticuerpo para unirse a un antígeno particular depende de las regiones variables de cada par de cadenas ligera/pesada, y está determinada en gran medida por las CDR.

Como se emplea en la presente memoria, la expresión "derivado de un anticuerpo de inmunoglobulina G de clase 1 (IgG1) humana" se refiere a un anticuerpo quimérico o humanizado. Comprendiendo tal anticuerpo derivado:

- 40 i) el dominio constante de la cadena ligera (CL) y los dominios constantes de la cadena pesada (CH1, CH2 y CH3) de una IgG1 humana; y
- ii) la Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR) y la Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR), o las correspondientes CDR, no de una IgG1 humana.

45 El término "fragmentos funcionales" como se emplea en la presente memoria se refiere a fragmentos de anticuerpos, que se unen específicamente al gangliósido GD2 O-acetilado y que comprenden un dominio CH1. Tales fragmentos pueden ser identificados simplemente por el experto en la técnica y comprenden, como ejemplo, están incluidos en la invención el fragmento F_{ab} (p. ej., mediante digestión con papaína), el fragmento F_{ab}' (p. ej., mediante digestión con pepsina y reducción parcial), el fragmento F(ab')₂ (p. ej., mediante digestión con pepsina), F_{acb} (p. ej., mediante digestión con plasmina), y también el fragmento F_d (p. ej., mediante digestión con pepsina, reducción parcial y re-agregación).

50 Tales fragmentos pueden ser producidos mediante escisión enzimática, mecanismos sintéticos o recombinantes, como los conocidas en la técnica y/o como se describe en la presente memoria. Los anticuerpos también se pueden

producir en una variedad de formas truncadas utilizando genes de anticuerpos en los que se han introducido uno o más codones de parada aguas arriba del sitio de parada natural. Por ejemplo, se puede diseñar un gen combinado que codifique una porción de cadena pesada de F(ab')₂ para que incluya secuencias de ADN que codifiquen el dominio CH₁ y/o la región bisagra de la cadena pesada. Las diversas porciones de anticuerpos se pueden reunir químicamente mediante mecanismos convencionales, o se pueden preparar como una proteína contigua utilizando mecanismos de ingeniería genética.

En una primera realización preferida, el método de la invención comprende la etapa de mutar el dominio CH1γ1 humano de dicho anticuerpo sustituyendo el aminoácido de la posición 133 o 134, según el índice EU como se expone en Kabat *et al.*, del dominio CH1γ1 humano de dicho anticuerpo por un resto de cisteína, con el fin de restaurar el emparejamiento entre los dominios CH1 y CL que es típico de las subclases IgG2, IgG3 y IgG4 humanas.

El dominio CH1 de una IgG1 humana es bien conocido por el experto en la técnica. Como ejemplo, el dominio CH1 de una IgG1 humana corresponde a SEQ ID NO: 21.

Como se emplea en la presente memoria, la etapa de "mutación del dominio CH1γ1 humano para restaurar el emparejamiento entre los dominios CH1 y CL que es típico de las otras subclases de IgG", se refiere a un dominio CH1γ1 humano en donde un aminoácido ha sido sustituido por un resto de cisteína, preferiblemente en donde la posición del aminoácido 133 o 134 es una cisteína, y más preferiblemente en donde el aminoácido de la posición 133 es una cisteína. La numeración de la región constante es la del índice EU como se expone en Kabat *et al.* (1991, Publicación NIH Núm. 91-3242, National technical Information Service Springfield, VA). Como primer ejemplo, tal dominio CH1γ1 humano se refiere a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, en donde el resto de serina de la posición 133 ha sido sustituido por una cisteína. Como segundo ejemplo, tal dominio CH1γ1 humano se refiere a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 22, en donde el resto de serina de la posición 134 ha sido sustituido por una cisteína. El resto de cisteína de la posición 133 o 134 de la secuencia de CH1 restaura un enlace disulfuro entre la cadena ligera y la cadena pesada de los anticuerpos de la invención.

SEQ ID NO: 21	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKV
SEQ ID NO: 1	ASTKGPSVFPLAPCSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKV
SEQ ID NO: 22	ASTKGPSVFPLAPSCSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKV

Ventajosamente, la etapa de mutar el dominio CH1γ1 humano de dicho anticuerpo sustituyendo el aminoácido en la posición 133 o 134, según el índice EU expuesto en Kabat *et al.*, del dominio CH1γ1 humano de dicho anticuerpo por un resto de aminoácido de cisteína, para restaurar el emparejamiento los dominios CH1 y CL que es típico de las subclases IgG2, IgG3 e IgG4 humanas, se lleva a cabo mediante:

- a) aislamiento de una secuencia de ácido nucleico que comprende el dominio CH1 de un anticuerpo de inmunoglobulina G de clase 1 (IgG1) quimérico o humanizado, codificando preferiblemente dicha secuencia de ácido nucleico la cadena pesada del anticuerpo;

b) mutación del codón que codifica la posición 133 o 134 de dicho dominio CH1 para codificar el aminoácido cisteína (C) para proporcionar una secuencia de ácido nucleico mutada;

c) aportación a la secuencia de ácido nucleico mutada de elementos de expresión operables;

5 d) expresión conjunta del ácido nucleico mutado con una secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena ligera del anticuerpo en un anfitrión adecuado proporcionando de ese modo un anticuerpo de inmunoglobulina G de clase 1 (IgG1) quimérico o humanizado mutado; y

e) opcionalmente, aislamiento del anticuerpo mutado.

En una segunda realización preferida, el método de la invención comprende la etapa de sustituir dicho dominio CH1 γ 1 humano por el dominio CH1 de una IgG2 (CH1 γ 2), IgG3 (CH1 γ 3) o IgG4 (CH1 γ 4) humanas.

10 Los dominios CH1 de una IgG2, IgG3, y IgG4 humanas son bien conocidos para el experto en la técnica. Como ejemplo, el dominio CH1 de una IgG2 humana corresponde a SEQ ID NO: 23, el dominio CH1 de una IgG3 humana corresponde a SEQ ID NO: 2, y el dominio CH1 de una IgG4 humana corresponde a SEQ ID NO: 24.

SEQ ID NO: 23	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYT CNVDHKPSNTKVDKTV
SEQ ID NO: 2	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYT CNVNHKPSNTKVDKRV
SEQ ID NO: 24	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYT CNVDHKPSNTKVDKRV

15 Ventajosamente, la etapa de sustitución del dominio del dominio CH1 γ 1 humano de dicho anticuerpo por el dominio CH1 de una IgG2 (CH1 γ 2), IgG3 (CH1 γ 3) o IgG4 (CH1 γ 4) humanas se llevado a cabo por medio de:

a) aislamiento de una secuencia de ácido nucleico que comprende el dominio CH1 de un anticuerpo de inmunoglobulina G de clase 1 (IgG1) quimérico o humanizado, codificando dicha secuencia de ácido nucleico preferiblemente la cadena pesada del anticuerpo;

20 b) sustitución de dicha secuencia de ácido nucleico de CH1 γ 1 por una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio CH1 de una IgG2 (CH1 γ 2), IgG3 (CH1 γ 3) o IgG4 (CH1 γ 4) humanas para proporcionar una secuencia de ácido nucleico mutada;

c) aportación a la secuencia de ácido nucleico mutada de elementos de expresión operables;

25 d) expresión conjunta del ácido nucleico mutado con una secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena ligera del anticuerpo en un anfitrión adecuado proporcionando de ese modo un anticuerpo de inmunoglobulina G de clase 1 (IgG1) quimérico o humanizado mutado; y

e) opcionalmente, aislamiento del anticuerpo mutado.

En una realización más preferida, el método de la invención comprende adicionalmente la etapa de mutar el dominio

bisagra de IgG1 humana de dicho anticuerpo, con el fin de restaurar el emparejamiento entre la bisagra y el dominio CH2 que es típico de las subclases IgG2, IgG3 y IgG4 humanas, o de sustituir dicho dominio bisagra de IgG1 humana por el dominio de una IgG2, IgG3, IgG4 humanas, o un dominio bisagra truncado de una IgG3 humana que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 6, 7, 8 o 9.

- 5 El dominio bisagra de una IgG1 humana es bien conocido para el experto en la técnica y corresponde como ejemplo a SEQ ID NO: 3.

- 10 Como se emplea en la presente memoria, la etapa de "mutar el dominio bisagra humano de dicho anticuerpo, con el fin de restaurar el emparejamiento entre la bisagra y el dominio CH2 que es típico de otras subclases de IgG", se refiere a un dominio bisagra de IgG1 humana, en donde el resto de cisteína en la quinta posición de la secuencia de la bisagra ha sido sustituido por otro resto, preferiblemente por una serina. De hecho, dicha mutación da como resultado la restauración de la estructura de IgG típica. Como ejemplo de tal derivado, se puede citar SEQ ID NO: 4.

SEQ ID NO: 3	EPKSCDKTHTCPPCP
SEQ ID NO: 4	EPKSSDKTHTCPPCP

- 15 En una realización preferida, la mutación del dominio bisagra humano de dicho anticuerpo, con el fin de restaurar el emparejamiento entre la bisagra y el dominio CH2 que es típico de las subclases IgG2, IgG3 e IgG4 humanas, se lleva a cabo sustituyendo el resto de cisteína en la quinta posición de su secuencia por otro resto, preferiblemente por una serina.

Ventajosamente, la etapa de mutar el dominio bisagra humano de dicho anticuerpo, para restaurar el emparejamiento entre el dominio bisagra y CH2 que es típico de las subclases IgG2, IgG3 e IgG4 humanas, se realiza por medio de:

- 20 a) aislamiento de una secuencia de ácido nucleico que comprende el dominio bisagra de un anticuerpo de inmunoglobulina G clase 1 (IgG1) quimérico o humanizado, codificando preferiblemente dicha secuencia de ácido nucleico la cadena pesada del anticuerpo;
- 25 b) mutación del codón que codifica el resto de aminoácido cisteína (C) en la posición 5 de dicho dominio bisagra para codificar otro resto de aminoácido, preferiblemente un resto de serina, para proporcionar una secuencia de ácido nucleico mutada;
- c) aportación a la secuencia de ácido nucleico mutada de elementos de expresión operables;
- d) expresión conjunta del ácido nucleico mutado con una secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena ligera del anticuerpo en un anfitrión adecuado, proporcionando así un anticuerpo de inmunoglobulina G clase 1 (IgG1) quimérico o humanizado mutado; y
- 30 e) opcionalmente, aislamiento del anticuerpo mutado.

El dominio bisagra de una IgG2, IgG3 o IgG4 humanas es bien conocido por el experto en la técnica y corresponde como ejemplo a SEQ ID NO: 5 para IgG3. Los derivados de la IgG3 humana también son bien conocidos por el experto en la técnica y corresponden como ejemplo a SEQ ID NO: 6 a 9, preferiblemente a SEQ ID NO: 9.

SEQ ID NO: 5	ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPC PRCPEPKSCDTPPPCPRCP
SEQ ID NO: 6	ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPC PRCP
SEQ ID NO: 7	ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP

SEQ ID NO: 8	EPKSCDTPPPCPRCP
SEQ ID NO: 9	ELKTPLGDTTHTCPRCP

De manera más ventajosa, la etapa de sustitución del dominio bisagra de IgG1 humana de dicho anticuerpo, por el dominio bisagra de una IgG2, IgG3, IgG4 humanas, o un dominio de bisagra truncado forma una IgG3 humana que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 6, 7, 8 o 9, se realiza por medio de:

- 5 a) aislamiento de una secuencia de ácido nucleico que comprende el dominio bisagra de un anticuerpo de inmunoglobulina G clase 1 (IgG1) quimérico o humanizado, codificando preferiblemente dicha secuencia de ácido nucleico la cadena pesada del anticuerpo;
- b) sustitución de dicha secuencia de ácido nucleico del dominio bisagra de IgG1 por una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio bisagra de una IgG2, IgG3, IgG4 humanas o un dominio bisagra truncado de una IgG3 humana que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 6, 7, 8 o 9 para proporcionar una secuencia de ácido nucleico mutada;
- 10 c) aportación a la secuencia de ácido nucleico mutada de elementos de expresión operables;
- d) expresión conjunta del ácido nucleico mutado con una secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena ligera del anticuerpo en un anfitrión adecuado, proporcionando así un anticuerpo de inmunoglobulina G clase 1 (IgG1) quimérico o humanizado mutado; y
- 15 e) opcionalmente, aislamiento del anticuerpo mutado.

También se describe un anticuerpo, o fragmento funcional del mismo, que se puede obtener mediante el método de la invención, en donde dicho anticuerpo comprende:

- a) una cadena ligera que comprende las siguientes secuencias de aminoácidos:
 - 20 i) la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR) específica de un antígeno; y
 - ii) un dominio Constante (CL) kappa (κ) humano; y
- b) una cadena pesada que comprende las siguientes secuencias de aminoácidos:
 - i) la Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR) específica de dicho antígeno;
 - ii) los dominios CH2 y CH3 de una IgG1 humana; y
 - 25 iii) el dominio CH1 de una IgG1 humana, que está mutado para restaurar el emparejamiento entre los dominios CH1 y CL que es típico de otras subclases de IgG, o sustituido por un dominio CH1 de una IgG2, IgG3 o IgG4 humanas.

El término "anticuerpo", como se emplea en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo monoclonal *per se*. Un anticuerpo monoclonal puede ser un anticuerpo humano, un anticuerpo quimérico y/o un anticuerpo humanizado.

- 30 El dominio CL kappa (κ) humano es bien conocido por el experto en la técnica y corresponde, como ejemplo, a SEQ ID NO: 10.

SEQ ID NO: 10	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
---------------	---

Los dominios CH2 y CH3 de una IgG1 humana son bien conocidos por el experto en la técnica y corresponden como ejemplo a SEQ ID NO: 11.

SEQ ID NO: 11	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
---------------	---

Los anticuerpos útiles en la invención se producen de forma recombinante, ya que se requiere la manipulación de los anticuerpos típicamente murinos u otros anticuerpos no humanos con la especificidad apropiada para convertirlos a la forma humanizada. Los anticuerpos pueden o no estar glicosilados, aunque se prefieren los anticuerpos glicosilados. Los anticuerpos se entrecruzan adecuadamente mediante enlaces disulfuro, como es bien sabido.

El anticuerpo obtenido por el método de la invención es un anticuerpo quimérico. Por la expresión "anticuerpo quimérico" se entiende un anticuerpo que está compuesto de regiones variables de una inmunoglobulina murina y de regiones constantes de una inmunoglobulina humana. Esta alteración consiste simplemente en sustituir la región constante de un anticuerpo humano por la región constante murina, dando así como resultado una quimera humana/murina que puede tener una inmunogenicidad suficientemente baja como para ser aceptable para su uso farmacéutico. Para la presente invención, dicho anticuerpo quimérico comprende las regiones constantes de cadenas ligeras y pesadas humanas. Se ha informado todavía de varios métodos para producir tales anticuerpos quiméricos, formando así parte del conocimiento general del experto en la técnica (véase, p. ej., la Patente de Estados Unidos Núm. 5.225.539).

El anticuerpo obtenido por el método de la invención es un anticuerpo humanizado.

Por "anticuerpo humanizado" se entiende un anticuerpo que está compuesto parcial o totalmente por secuencias de aminoácidos derivadas de una línea germinal de un anticuerpo humano alterando la secuencia de un anticuerpo que tiene regiones determinantes de la complementariedad (CDR) no humanas. Esta humanización de la región variable del anticuerpo y eventualmente la CDR se realiza mediante mecanismos que ahora son bien conocidos en la técnica.

Como ejemplo, la Solicitud de Patente Británica GB 2188638A y la Patente de Estados Unidos Núm. 5.585.089 describen procesos en donde se producen anticuerpos recombinantes en los que la única parte del anticuerpo que está sustituida es la región determinante de complementariedad, o "CDR". La técnica de injerto de CDR se ha utilizado para generar anticuerpos que consisten en CDR murinas y regiones marco y constantes de la región variable humana (véase, p. ej., RIECHMANN et al., Nature, vol. 332, pág: 323-327, 1988). Estos anticuerpos retienen las regiones constantes humanas que son necesarias para la función efectora dependiente de Fc, pero es mucho menos probable que provoquen una respuesta inmunitaria contra el anticuerpo.

Como ejemplo, las regiones marco de las regiones variables se sustituyen por las regiones marco humanas correspondientes dejando la CDR no humana sustancialmente intacta, o incluso reemplazando la CDR por secuencias derivadas de un genoma humano. Los anticuerpos completamente humanos se producen en ratones modificados genéticamente cuyos sistemas inmunitarios se han alterado para que correspondan a los sistemas inmunitarios humanos. Como se mencionó anteriormente, es suficiente para su uso en los métodos de la invención, el empleo de un fragmento inmunológicamente específico del anticuerpo, incluyendo los fragmentos que representan formas monocatenarias.

Un anticuerpo humanizado nuevamente se refiere a un anticuerpo que comprende un marco humano, al menos una CDR de un anticuerpo no humano, y en el que cualquier región constante presente es sustancialmente idéntica a una región constante de inmunoglobulina humana, es decir, al menos aproximadamente 85 o 90%, preferiblemente al menos 95% idéntica. Por tanto, todas las partes de un anticuerpo humanizado, excepto posiblemente las CDR, son sustancialmente idénticas a las partes correspondientes de una o más secuencias de inmunoglobulina humana nativa. Por ejemplo, una inmunoglobulina humanizada normalmente no abarcaría un anticuerpo quimérico de región variable de ratón/región constante humana.

Los anticuerpos humanizados tienen al menos tres ventajas potenciales sobre los anticuerpos quiméricos y no humanos para su uso en terapia en seres humanos:

- 1) Debido a que la porción efectora es humana, puede interactuar mejor con las otras partes del sistema

inmunológico humano (p. ej., destruir las células diana de manera más eficiente mediante citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)).

2) El sistema inmunológico humano no debería reconocer el marco o la región C del anticuerpo humanizado como foráneo y, por lo tanto, la respuesta del anticuerpo contra dicho anticuerpo inyectado debería ser menor que contra un anticuerpo no humano totalmente foráneo o un anticuerpo quimérico parcialmente foráneo.

3) Se ha informado de que los anticuerpos no humanos inyectados tienen una semivida en la circulación humana mucho más corta que la semivida de los anticuerpos humanos. Los anticuerpos humanizados inyectados tendrán una semivida esencialmente idéntica a la de los anticuerpos humanos naturales, lo que permitirá administrar dosis más pequeñas y menos frecuentes.

Como ejemplo, el diseño de inmunoglobulinas humanizadas se puede llevar a cabo de la siguiente manera: cuando un aminoácido cae en la siguiente categoría, el aminoácido del marco de una inmunoglobulina humana que se va a utilizar (inmunoglobulina aceptora) se reemplaza por un aminoácido del marco de una Inmunoglobulina no humana que proporciona la CDR (inmunoglobulina donadora): (a) el aminoácido en la región marco humana de la inmunoglobulina aceptora es inusual para la inmunoglobulina humana en esa posición, mientras que el aminoácido correspondiente en la inmunoglobulina donadora es típico de la inmunoglobulina humana en esa posición; (b) la posición del aminoácido es inmediatamente adyacente a una de las CDR; o (c) cualquier átomo de la cadena lateral de un aminoácido del marco está dentro de aproximadamente 5-6 angstroms (de centro a centro) de cualquier átomo de un aminoácido de la CDR en un modelo de inmunoglobulina tridimensional (QUEEN et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., vol.88, pág: 2869, 1991). Cuando cada uno de los aminoácidos en la región marco humana de la inmunoglobulina aceptora y un aminoácido correspondiente en la inmunoglobulina donadora es inusual para la inmunoglobulina humana en esa posición, tal aminoácido es reemplazado por un aminoácido típico de la inmunoglobulina humana en esa posición.

El anticuerpo o fragmento del mismo están dirigidos contra un inmunorregulador, un antígeno infeccioso o tumoral.

La Región Variable de Cadena Ligera y Pesada (LCVR y HCVR) específica de tal antígeno puede ser identificada simplemente por el experto en la técnica en vista de su conocimiento general.

Como se emplea en la presente memoria, un "antígeno inmunorregulador" se refiere a un antígeno expresado por células inmunitarias inductoras activadas, tales como células T y/o NK o por células supresoras activadas.

Como ejemplo de un antígeno expresado por células supresoras activadas, se puede citar CTL-A4 (Antígeno Asociado a Linfocitos Citotóxicos, también denominado CD 152) que se descubrió en 1987 (BRUNET et al., Nature, vol. 328, pág: 267-270, 1987).

Como ejemplo de antígeno expresado por células inmunitarias inductoras activadas, se puede citar BTLA (atenuador de linfocitos B y T), también conocido como CD272, que se induce durante la activación de las células T y permanece expresado sobre las células Th1 pero no sobre las células Th2.

Como se emplea en la presente memoria, un "antígeno infeccioso" se refiere a una sustancia antigénica producida en células infectadas por un microbio tal como una bacteria o un virus.

Como se emplea en la presente memoria, un "antígeno tumoral" se refiere a una sustancia antigénica producida en células tumorales. Muchos antígenos tumorales son bien conocidos por el experto en la técnica y se pueden citar, como ejemplos no limitantes, CD20, CEA, EGFR, HER2, EPCAM, MUC1, PSMA, CD-19, GM1, CAIX, antígenos de fosfolípidos tales como fosfatidilserina o gangliósidos tales como GD2, GD2-O-acetilado o GD3.

Preferiblemente, dicho antígeno no corresponde a GD2-O-acetilado.

CD-20 es una fosfoproteína no glicosilada que se expresa durante el desarrollo temprano de las células pre-B y permanece hasta la diferenciación de las células plasmáticas. Específicamente, la molécula de CD20 puede regular una etapa en el proceso de activación que se requiere para el inicio y la diferenciación del ciclo celular y normalmente se expresa a niveles muy altos en células B neoplásicas ("tumorales"). CD20, por definición, está presente tanto en las células B "normales" como en las células B "malignas". Por tanto, el antígeno de superficie CD20 tiene el potencial de servir como candidato para "dirigirse" a los linfomas de células B.

En cuanto a los anticuerpos dirigidos contra CD20, con el fin de obtener sus correspondientes Regiones Variables de Cadena Ligera y Pesada (LCVR y HCVR) específicas de CD20, se puede citar rituximab ("RITUXAN®") (Patente de Estados Unidos Núm. 5.736.137); el anticuerpo murino 2B8 marcado con itrio-[90] designado "Y2B8" o "Ibritumomab Tiuxetan" ZEVALIN® (Patente de Estados Unidos Núm. 5.736.137); la IgG2a murina "BI", también llamada "Tositumomab", opcionalmente marcada con ¹³¹I para generar el "¹³¹I-BI" (yoduro 131 tositumomab, BEXXAR®) (Patente de Estados Unidos Núm. 5.595.721); y 2H7 humanizado; Ofatumumab, una IgG1 completamente humanizada contra un epítipo nuevo sobre CD20 huMax-CD20 (Solicitud de patente internacional PCT WO 2004/035607). Entre ellos, rituximab, ibritumomab, tiuxetan y tositumomab recibieron la aprobación comercial para el tratamiento de linfomas específicos, y Ofatumumab recibió aprobación comercial para el tratamiento de leucemias

específicas. Preferiblemente, dicho anticuerpo dirigido contra CD20 es rituximab y corresponde a las secuencias presentadas en las siguientes tablas para Regiones Variables de Cadena Pesada (HCVR; SEQ ID NO: 25 a 31), y para Regiones Variables de Cadena Ligera (LCVR; SEQ ID NO: 32 a 37).

Anti-CD20 (rituximab) Cadena Pesada Variable:

SEQ ID NO: 25	FR1	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKAS
SEQ ID NO: 26	CDR1	GYTFTSYN
SEQ ID NO: 27	FR2	MHWVKQTPGRGLEWIGA
SEQ ID NO: 28	CDR2	IYPGNGDT
SEQ ID NO: 29	FR3	SYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYC
SEQ ID NO: 30	CDR3	ARSTYYGGDWYFNV
SEQ ID NO: 31	FR4	WGAGTTVTVSA

5

Anti-CD20 (rituximab) Cadena Ligera Variable (cadena k):

SEQ ID NO: 32	FR1	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRAS
SEQ ID NO: 33	CDR1	SSVS
SEQ ID NO: 34	FR2	IHWFQQKPGSSPKPWIY
	CDR2	ATS
SEQ ID NO: 35	FR3	NLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYC
SEQ ID NO: 36	CDR3	QQWTSNPPT
SEQ ID NO: 37	FR4	FGGGTKLEIK

Más preferiblemente, la secuencia de CH1 y de la bisagra de rituximab corresponde a SEQ ID NO: 38.

SEQ ID NO: 38	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
---------------	--

10 La glicoproteína CEA (antígeno carcinoembrionario) es un marcador tumoral involucrado en la adherencia celular. En cuanto a los anticuerpos dirigidos contra CEA, para obtener sus correspondientes Regiones Variables de Cadena Ligera y Pesada (LCVR y HCVR) específicas de CEA, se puede citar arcitumomab (IMMUNOMEDICS).

15 Los receptores de ErbB se expresan en diversos tejidos de origen epitelial, mesenquimatoso y neuronal. En condiciones normales, la activación de los receptores de ErbB está controlada por la expresión espacial y temporal de sus ligandos, que son miembros de la familia de factores de crecimiento EGF. La unión del ligando a los receptores de ErbB induce la formación de homo y heterodímeros del receptor y la activación del dominio quinasa intrínseco, lo que da como resultado la fosforilación de restos de tirosina quinasa específicos dentro de la cola citoplasmática. Estos restos fosforilados sirven como sitios de acoplamiento para diversas proteínas, cuyo

reclutamiento conduce a la activación de vías de señalización intracelular. Entre los receptores de ErbB, se sabe que EGFR y HER2 juegan un papel esencial en la regulación de la proliferación y diferenciación celulares. Tienen una fuerte tendencia a ensamblarse con otros receptores de HER en homo y/o heterodímeros tras la unión del factor de crecimiento extracelular, lo que da como resultado diversas formas de activación de las vías de transducción de señales, lo que conduce a la apoptosis, supervivencia o proliferación celulares.

En cuanto a los anticuerpos dirigidos contra EGFR, para obtener sus correspondientes Regiones Variables de Cadena Ligera y Pesada (LCVR y HCVR) específicas de EGFR, se pueden citar el anticuerpo monoclonal humanizado 425, también denominado matuzumab (hMAb 425, Patente de Estados Unidos Núm. 5.558.864; documento EP 0531 472), el anticuerpo monoclonal quimérico 225 (cMAb 225), también denominado cetuximab (ERBITUX®; Patente de Estados Unidos Núm. 7.060.808), y el anticuerpo anti-EGFR completamente humano panitumumab (VECTIBIX®; Patente de Estados Unidos Núm. 6.235.883). Entre ellos, se demostró que cetuximab y panitumumab inhiben los tumores colorrectales humanos *in vivo* y ambos recibieron una marcada aprobación.

En cuanto a los anticuerpos dirigidos contra Her2, para obtener sus correspondientes Regiones Variables de Cadena Ligera y Pesada (LCVR y HCVR) específicas de Her2, se pueden citar la versión humanizada recombinante del anticuerpo de ratón 4D5 ((Patente de Estados Unidos Núm. 5.677.171), designado huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, trastuzumab o HERCEPTIN® (Patente de Estados Unidos Núm. 5.821.337). Este anticuerpo recibió la aprobación de comercialización en 1998 para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico cuyos tumores expresan en exceso la proteína ErbB2. Preferiblemente, dicho anticuerpo dirigido contra Her2 es trastuzumab y corresponde respectivamente a las secuencias presentadas en las siguientes tablas para las Regiones Variables de Cadena Pesada (HCVR; SEQ ID NO: 39 a 45), y para Regiones Variables de Cadena Ligera (LCVR; SEQ ID NO: 46 a 51).

Anti-Her2 (trastuzumab) Cadena Pesada Variable:

SEQ ID NO: 39	FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
SEQ ID NO: 40	CDR1	GFNIKDTY
SEQ ID NO: 41	FR2	IHWVRQAPGKGLEWVAR
SEQ ID NO: 42	CDR2	IYPTNGYT
SEQ ID NO: 43	FR3	RYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC
SEQ ID NO: 44	CDR3	SRWGGDGFYAMDY
SEQ ID NO: 45	FR4	WGQGTLLTVSS

Anti-Her2 (trastuzumab) Cadena Ligera Variable (cadena k):

SEQ ID NO: 46	FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS
SEQ ID NO: 47	CDR1	QDVNTA
SEQ ID NO: 48	FR2	VAWYQQKPGKAPKLLIY
	CDR2	SAS
SEQ ID NO: 49	FR3	FLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
SEQ ID NO: 50	CDR3	QQHYTTPPT
SEQ ID NO: 51	FR4	FGQGTKVEIK

Más preferiblemente, la secuencia de CH1 y de la bisagra de trastuzumab corresponde a SEQ ID NO: 38.

GD2 es un disialogangliósido expresado en tumores de origen en el neuroectodermo, incluidos el neuroblastoma y el melanoma. En cuanto a los anticuerpos dirigidos contra GD2, para obtener sus correspondientes Regiones Variables de Cadena Ligera y Pesada (LCVR y HCVR) específicas de GD2, se pueden citar los anticuerpos monoclonales IgG3 murinos 3F8 y 14.18, o el anticuerpo monoclonal quimérico anti-GD2 ch14.18 (formado por la región variable del anticuerpo anti-GD2 murino 14.18 y la región constante de la IgG1 humana), que se han utilizado en el tratamiento del neuroblastoma, o el anticuerpo monoclonal IgG3 murino 8B6, que es específico de la forma O-acetilada de GD2 (Solicitud de patente internacional PCT WO 2008/043777). Preferiblemente, dicho anticuerpo dirigido contra GD2 es ch14.18 y corresponde respectivamente a las secuencias presentadas en las siguientes tablas para las Regiones Variables de Cadena Pesada (HCVR; SEQ ID NO: 52 a 57) y para las Regiones Variables de Cadena Ligera (LCVR; SEQ ID NO: 58 a 63).

Anti-GD2 (ch14.18) Cadena Pesada Variable:

SEQ ID NO: 52	FR1	EVQLQSGPELEKPGASVMISCKAS
SEQ ID NO: 53	CDR1	GSSFTGYN
SEQ ID NO: 54	FR2	MNWVRQNIGKSLEWIGA
SEQ ID NO: 55	CDR2	IDPYYGGT
SEQ ID NO: 56	FR3	SYNQKFKGRATLTVDKSSSTAYMHLKSLTSEDSAVYYC
SEQ ID NO: 57	CDR3	VSGMEY
SEQ ID NO: 58	FR4	WGQGTSVTVSS

Anti-GD2 (ch14.18) Cadena Ligera Variable (cadena k):

SEQ ID NO: 59	FR1	DVVMQTPLSLPISLGDQASISCRSS
SEQ ID NO: 60	CDR1	QSLVHRNGNTYL
SEQ ID NO: 61	FR2	HWYLQKPGQSPKLLIH
	CDR2	KVS
SEQ ID NO: 62	FR3	NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFC
SEQ ID NO: 63	CDR3	SQSTHVPPLT
SEQ ID NO: 64	FR4	FGAGTKLELN

Más preferiblemente, la secuencia de CH1 y de la de ch14.18 corresponde a SEQ ID NO: 38.

Como se emplea en la presente memoria, un "antígeno tumoral" también se puede referir a una neovascularización tumoral o a un antígeno de matriz extracelular tumoral.

Como se emplea en la presente memoria, un "antígeno relacionado con la neovascularización del tumor" se refiere a un antígeno que es expresado por los vasos sanguíneos neo-sintetizados presentes en el tumor.

Como ejemplo de tal antígeno, se pueden citar los dominios EDA y EDB de fibronectina, endosalina/TEM1, Endogлина/105, PSMA o B7-H4.

Como se emplea en la presente memoria, un "antígeno relacionado con la matriz extracelular del tumor" se refiere a un antígeno que se expresa en la matriz extracelular presente en el tumor.

Como ejemplo de tal antígeno, se puede citar el fragmento G45 de laminina-332 (ROUSSELLE et al., Cancer

Research, vol.68 (8), pág: 2885-94, 2008).

El anticuerpo obtenido mediante el método de la invención comprende un dominio CH1 γ 1 humano en donde un aminoácido ha sido sustituido por un resto de cisteína, preferiblemente en donde el aminoácido en la posición 133 o 134 es una cisteína, y más preferiblemente en donde el aminoácido en la posición 133 es una cisteína. La numeración de la región constante es la del índice UE como se establece en Kabat *et al.* (1991, NIH Publication Núm. 91-3242, Servicio Nacional de Información Técnica Springfield, VA). Como ejemplo, tal dominio CH1 γ 1 humano mutado se refiere a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, en donde el resto de serina en la posición 133 ha sido sustituido por una cisteína. El resto de cisteína en la posición 133 o 134 de la secuencia de CH1 restaura un disulfuro unido entre la cadena ligera y la cadena pesada de los anticuerpos de la invención.

El anticuerpo obtenido por el método de la invención comprende un dominio CH1 de una IgG2, IgG3 o IgG4 humanas, preferiblemente dicho dominio es un dominio CH1 de una IgG3, tal como la secuencia SEQ ID NO: 2.

Si bien el anticuerpo de la invención puede comprender un dominio bisagra de una IgG1 humana, también puede comprender un dominio bisagra humano, que es una bisagra de IgG1 humana mutada para restaurar el apareamiento típico de IgG, o que es un dominio bisagra de una IgG2, IgG3, IgG4 humanas o un derivado de las mismas.

Una "bisagra de IgG1 humana mutada para restaurar el emparejamiento de IgG típico" se refiere a un dominio bisagra de IgG1, en donde el resto de cisteína en la quinta posición de su secuencia ha sido sustituido por otro resto, preferiblemente por una serina. De hecho, dicha mutación da como resultado la restauración de la estructura típica de IgG. Como ejemplo de tal derivado, se puede citar SEQ ID NO: 4.

El dominio bisagra de una IgG2, IgG3 o IgG4 humanas es bien conocido por el experto en la técnica y corresponde como ejemplo a SEQ ID NO: 5 para IgG3. Los derivados de la IgG3 humana también son bien conocidos por el experto en la técnica y corresponden como ejemplo a SEQ ID NO: 6 a 9, preferiblemente a SEQ ID NO: 9.

Preferiblemente, la introducción de un resto de cisteína dentro de los anticuerpos de la invención por un dominio CH1 mutado de una IgG1 humana que presenta un resto de cisteína en las posiciones 133 o 134 de su secuencia, o por un dominio CH1 de una IgG2, IgG3 o IgG4, no libera ningún grupo tiol libre previamente ligado a otro resto de cisteína.

Los anticuerpos obtenidos mediante el método de la invención abarcan productos inmunoconjugados.

Como se emplea en la presente memoria, el término "producto inmunoconjugado" se refiere a una molécula conjugada que comprende al menos un anticuerpo quimérico o un fragmento funcional del mismo, unido a una segunda molécula, preferiblemente un agente citotóxico o un radioisótopo. Preferiblemente, dicho anticuerpo o fragmento funcional del mismo se unen a dicha segunda molécula mediante enlace covalente.

En una realización, el anticuerpo obtenido mediante el método de la invención es un producto inmunoconjugado.

En una realización particular, el anticuerpo obtenido mediante el método de la invención es un producto inmunoconjugado en donde dicho producto inmunoconjugado comprende un anticuerpo de la invención o un fragmento funcional del mismo y un agente citotóxico.

En otra realización particular, el anticuerpo obtenido mediante el método de la invención es un producto inmunoconjugado en donde dicho producto inmunoconjugado comprende un anticuerpo de la invención o un fragmento funcional del mismo y un radioisótopo.

Según un segundo aspecto, la presente invención se relaciona con una composición, preferiblemente una composición farmacéutica, que comprende al menos un anticuerpo obtenido mediante el método de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable para su uso en terapia.

Dicha composición es particularmente útil para el tratamiento de cáncer, enfermedad autoinmune o infección.

Dicha composición puede estar en cualquier forma farmacéutica adecuada para su administración a un paciente, incluidas, entre otras, soluciones, suspensiones, polvos liofilizados, cápsulas y comprimidos.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender adicionalmente cualquier diluyente, excipiente o auxiliar farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica de la invención se puede formular para inyección, p. ej. inyección local, administración transmucosa, inhalación, administración oral y más generalmente cualquier formulación que el experto en la técnica considere apropiada para lograr la terapia deseada.

El anticuerpo obtenido mediante el método de la invención está contenido en dicha composición farmacéutica en una cantidad eficaz para lograr el propósito pretendido y a dosis adecuadas para la vía de administración elegida.

Más específicamente, una dosis terapéuticamente eficaz representa una cantidad de un compuesto eficaz para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas del sujeto que padece cáncer o una infección.

Dependiendo de la aplicación pretendida, el anticuerpo quimérico de la invención puede comprender adicionalmente constituyentes adicionales. Como ejemplo, el anticuerpo quimérico de la invención puede corresponder a un producto inmunoconjugado.

También se describe un método para el tratamiento del cáncer o una infección que comprende la etapa de administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de la composición como se describe en la presente memoria, que comprende al menos un anticuerpo, o al menos un fragmento funcional del mismo como se describe en la presente memoria.

En un tercer aspecto, la presente invención se relaciona con una composición para su uso en un método para el tratamiento del cáncer.

Como se emplea en la presente memoria, el término "paciente" se refiere a un mamífero, preferiblemente a un ser humano.

Otras realizaciones y ventajas de la presente invención se ilustran en los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

1 - Actividad pro-apoptótica del anticuerpo anti-OAcGD2 *in vitro*

En una primera etapa, el anticuerpo quimérico anti-OAcGD2, c8B6, se ha diseñado a partir de 8B6 sustituyendo sus regiones constantes por la de una IgG1, κ humana. Sus secuencias están representadas en la figura 1 (SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13).

La estructura de este anticuerpo comprende 2 enlaces disulfuro intramoleculares en cadena ligera (Cys23-Cys93 y Cys139-Cys199) y 4 enlaces disulfuro intramoleculares en cadena pesada (Cys22-Cys98, Cys146-Cys202, Cys263-Cys323 y Cys369-Cys427). Los restos de cisteína implicados en enlaces disulfuro intracadena se indican con una estrella (*). Toda la estructura está estabilizada por 3 enlaces disulfuro intermoleculares: la cadena ligera está conectada a la cadena pesada por un enlace disulfuro entre el último resto de cisteína de la cadena ligera y el resto de cisteína de la región de bisagra superior (Cys219-Cys 222), y las cadenas pesadas están conectadas por 2 enlaces disulfuro que conectan la cisteína en la bisagra central (Cys228-Cys228 y Cys231-Cys231). Los restos de cisteína implicados en los enlaces disulfuro entre cadenas se indican con una flecha (†).

La LCVR de 8B6 se clona NotI-KasI en un vector pEvi para fusionarse con el dominio CL de una IgG1 humana.

El dominio de HCVR de 8B6 se clona NotI-NheI en un vector pEvi' para fusionarse con el dominio constante de la cadena pesada de una IgG1 humana.

En ese caso, las células CHO K1 son cotransfectadas por ambos vectores.

Después de la transfección, las células CHO K1 se mantienen en un medio sin suero durante varios días.

Cada día, el medio de cultivo se recolecta y se congela a -80°C. Se añade un nuevo medio a las células transfectadas hasta que la viabilidad celular es inferior a 70-80%.

Los medios de cultivo recolectados se combinan y el anticuerpo se purifica utilizando proteína A inmovilizada sobre una matriz de sefarosa.

La producción de c8B6 en CHO se analizó mediante electroforesis tanto en condiciones reductoras como no reductoras. Los resultados han demostrado que en condiciones no reductoras, el anticuerpo c8B6 mostró una banda a 150 kD correspondiente al anticuerpo completo. Mientras que, en condiciones reductoras, se observó una banda a 50 kD para HC y una banda a 25 kD para LC. La filtración en gel en una columna SUPERDEX mostró un perfil de cromatograma con un pico principal (99,0% para el grado de pureza) a 12,3 ml correspondiente a 150 kD. Finalmente, el rendimiento de producción del c8B6 quimérico después de la purificación en una columna de proteína A fue de aproximadamente 315 mg/L de sobrenadante.

La unión del anticuerpo a su diana se confirmó mediante citometría de flujo en células IRM5 que expresan gangliósido GD2-O-acetilado. La unión fue revelada por un anti-IgG humana de cabra conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Estos experimentos han confirmado la funcionalidad de este anticuerpo, que se une a GD2-O-acetilado.

A continuación, se evaluó la citotoxicidad directa del anticuerpo c8B6 mediante ensayos MTT.

En estos ensayos, se incubaron 1×10^4 células IMR5 24 h a 37°C en una microplaca de 96 pocillos. Se añadieron anticuerpos de 80-0,15 μ g/ml y se incubaron durante 24 h a 37°C. A continuación, se añadieron cincuenta μ g de

MTT a cada pocillo y se incubaron al menos 4 h a 37°C, antes de que las células se solubilizaran con SDS al 10% y se incubasen O.N. a 37°C. A continuación, se leyó la absorbancia a 570 y 650 nm. La absorbancia del producto a 650 nm se restó de la absorbancia a 570 nm (Abs570-Abs650) para calcular la conversión total de colorante. Cuatro pocillos de control con células tratadas con 20 µg de etopósido proporcionan el blanco para absorbancia proporcionando 0% de viabilidad. La inhibición de la viabilidad (%) se expresó como un porcentaje con respecto a las células no tratadas y cada valor se representa como media ± ETM por cuadruplicado.

Los resultados han demostrado que el anticuerpo c8B6 ha perdido la citotoxicidad directa de 8B6 después de la etapa de quimerización al pasar de dominios constantes de IgG3 murinos a dominios constantes de IgG1 humanos. Por otra parte, el anticuerpo perdió aún más las propiedades de cooperación de la IgG3 8B6 parental.

Finalmente, muchos experimentos que prueban diferentes formas de quimerización solo restauran poca actividad pro-apoptótica, y no se observó cooperación en la unión.

Sorprendentemente, las modificaciones específicas del dominio constante CH1 para la quimerización dan como resultado grandes cambios para la actividad pro-apoptótica.

Estos resultados se obtuvieron con los anticuerpos 301.14a, 301.14b, 301.15, 301.15b, 301.16, 301.17, 301.18, 301.19, 301.20 y 301.21 que se diseñaron sobre la base de las construcciones anteriores.

El anticuerpo 301.14a corresponde a un CH1γ1 humano mutado (mutación S133C subrayada) con el dominio Bisagra γ1 humano como se representa en la figura 2 (SEQ ID NO: 14). Los otros dominios constantes corresponden a los dominios CH2 y CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 11) y el dominio CL kappa (SEQ ID NO: 10).

El anticuerpo 301.14b corresponde a un CH1γ1 humano mutado (mutación S133C subrayada) con un dominio Bisagra γ1 humano mutado (mutación C222S subrayada) como se representa en la figura 3 (SEQ ID NO: 15). Los otros dominios constantes corresponden a los dominios CH2 y CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 11) y el dominio CL kappa (SEQ ID NO: 10).

El anticuerpo 301.15 corresponde a un CH1γ3 humano (que reemplaza a su primo CH1γ1) con el dominio Bisagra γ1 humano como se representa en la figura 4 (SEQ ID NO: 16). Los otros dominios constantes corresponden a los dominios CH2 y CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 11) y el dominio CL kappa (SEQ ID NO: 10).

El anticuerpo 301.15b corresponde a un CH1γ3 humano (que reemplaza a su primo CH1γ1) con un dominio Bisagra γ1 humano mutado (mutación subrayada correspondiente a la sustitución de la cisteína 222 por un residuo de serina, C222S) como se representa en la figura 9 (SEQ ID NO: 66). Los otros dominios constantes corresponden a los dominios CH2 y CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 9) y el dominio CL kappa (SEQ ID NO: 8).

El anticuerpo 301.16 corresponde a un CH1γ1 humano mutado (mutación subrayada S133C) con el dominio Bisagra γ3 humano (en sustitución de su primo Bisagra γ1) como se representa en la figura 5 (SEQ ID NO: 17). Los otros dominios constantes corresponden a los dominios CH2 y CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 11) y el dominio CL kappa (SEQ ID NO: 10).

El anticuerpo 301.17 corresponde a un CH1γ3 humano (que reemplaza a su primo CH1γ1) con el dominio Bisagra γ3 humano (que reemplaza a su primo Bisagra γ1) como se representa en la figura 6 (SEQ ID NO: 18). Los otros dominios constantes corresponden a los dominios CH2 y CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 11) y el dominio CL kappa (SEQ ID NO: 10).

El anticuerpo 301.18 corresponde a un CH1γ1 humano mutado (mutación subrayada S133C) con un dominio Bisagra γ3 humano acortado (17 aminoácidos) como se representa en la figura 7 (SEQ ID NO: 19). Los otros dominios constantes corresponden a los dominios CH2 y CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 11) y el dominio CL kappa (SEQ ID NO: 10).

El anticuerpo 301.19 corresponde a un CH1γ3 humano (que reemplaza a su primo CH1γ1) con un dominio Bisagra γ3 humano acortado (17 aminoácidos) como se representa en la figura 8 (SEQ ID NO: 20). Los otros dominios constantes corresponden a los dominios CH2 y CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 11) y el dominio CL kappa (SEQ ID NO: 10).

El anticuerpo 301.20 corresponde a un CH1γ2 humano (que reemplaza a su primo CH1γ1) con el dominio Bisagra γ1 humano como se representa en la figura 10 (SEQ ID NO: 23). Los otros dominios constantes corresponden a los dominios CH2 y CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 9) y el dominio CL kappa (SEQ ID NO: 8).

El anticuerpo 301.21 corresponde a un CH1γ4 humano (que reemplaza a su primo CH1γ1) con el dominio Bisagra γ1 humano como se representa en la figura 11 (SEQ ID NO: 24). Los otros dominios constantes corresponden a los dominios CH2 y CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 9) y el dominio CL kappa (SEQ ID NO: 8).

El control mulgG3 corresponde a una IgG3 8B6 murina, en donde CH1 de IgG3 corresponde a SEQ ID NO: 64, en donde el resto de cisteína en la posición 134 está sustituido por un resto de serina y el resto de serina en la posición 224 está sustituido por un resto de cisteína.

SEQ ID NO: 64	ATTTAPSVYPLVPGCSDTSGSSVTLGCLVKGYFPEPVTVKWN GALSSGVRTVSSVLQSGFYSLSSLVTVPSSTWPSQTVICNVAHP ASKTELKRIEPRIPKPCTPPGSSCP
---------------	---

La unión de dichos anticuerpos al gangliósido GD2-O-acetilado se confirmó como anteriormente.

A continuación, se determinaron las actividades pro-apoptóticas potenciales de dichos anticuerpos como se mencionó anteriormente.

- 5 Los resultados se resumen en las siguientes tablas, donde el porcentaje de lisis es el obtenido para una concentración de anticuerpo de 80 µg/ml.

Citotoxicidad directa de anticuerpos anti-OacGD2 301.14a, 301.14b, 301.15, 301.16, 301.17, 301.18 y 301.19 sobre células IMR5:

Construcción	Media +/- ETM de n=2 experimentos		Afinidad (Eq)
	CE ₅₀ (µg/ml)	% Lisis máxima	Kd (nM)
8B6	10,0 ± 1,8	33,3 ± 5,6	46,9 ± 15,0
c8B6	14,7 ± 16,6	7,3 ± 5,4	208,3 ± 90,9
301.14a	6,5 ± 0,3	20,2 ± 7,4	ND
301.14b (n=1)	1,0	33,8	103,6 ± 22,5
301.15	3,6 ± 2,0	45,0 ± 13,9	161,9 ± 42,0
301.16	2,1 ± 2,0	29,2 ± 17,3	ND
301.17	3,2 ± 0,8	20,8 ± 3,0	ND
301.18	8,5 ± 0,6	31,0 ± 1,7	63,9 ± 8,6
301.19	7,6 ± 1,4	37,5 ± 0,5	54,5 ± 6,2

- 10 Los resultados muestran que, inesperadamente, los anticuerpos quiméricos que comprenden un CH1γ1 δ humano mutado o un CH1γ3 humano tienen una actividad pro-apoptótica, lo que significa que la pérdida de citotoxicidad directa podría deberse a la estructura de la IgG1 humana. Por otra parte, todos estos anticuerpos muestran una CE₅₀ mayor que la del anticuerpo inicial 8B6.

- 15 Los resultados también han demostrado que la construcción que produjo el efecto citotóxico más alto en términos de % de lisis máximo corresponde (i) a la fusión de CH1γ3 humano y Bisagra γ1 humana (construcción 301.15) o (ii) a la fusión de CH1 γ1 humano (mutada en S133C) o CH1 γ3 humano y bisagra humana γ3 acortada (construcciones 301.18 y 301.19). Para estos 2 últimos, se observó un aumento de afinidad en comparación con el c8B6 original.

Finalmente, y todavía sorprendentemente, el anticuerpo 301.15 fue el único que presentó un perfil agregante en las curvas de competición correspondientes a una cooperatividad de unión restaurada.

- 20 Citotoxicidad directa de anticuerpos anti-OacGD2 301.15b, 301.20 y 301.21 sobre células IMR5, SUM159PT y H187:

Línea celular	Anticuerpo	Lisis max. (80 µg/ml)	CE50 (µg/ml)
IMR5	301.15b	58,67	2,53
	301.20	79,92	11,60
	301.21	60,88	26,12
SUM159PT	8B6	64,76	25,42
	301.14b	63,99	1,92
	301.15	75,53	19,19
	c8B6	0,00	ND
H187	8B6	68,46	3,30
	301.14b	65,42	2,27
	301.15	70,96	7,72
	c8B6	0,00	ND

Los resultados muestran que, inesperadamente, los anticuerpos quiméricos que comprenden un CH1γ2 o CH1γ4 humano tienen una actividad pro-apoptótica sobre las células IMR5, lo que significa que la pérdida de citotoxicidad directa podría deberse a la estructura de la IgG1 humana. Por otra parte, los anticuerpos quiméricos que comprenden un CH1γ3 humano y un dominio Bisagra γ1 humano mutado (mutación subrayada correspondiente a la sustitución de la cisteína 222 por un resto de serina, C222S) tienen una actividad pro-apoptótica sobre células IMR5.

Los resultados también han demostrado que las construcciones correspondientes a la fusión de CH1 γ1 humano (mutado en S133C) y un dominio Bisagra γ1 humano mutado (mutación subrayada correspondiente a la sustitución de la cisteína 222 por un resto de serina, C222S) (construcción 301.14b) o la fusión de CH1γ3 humano y Bisagra γ1 humana (construcción 301.15) tiene actividad pro-apoptótica sobre células SUM159PT y H187.

La citotoxicidad directa de los anticuerpos 301.14b y 301.15 también se evaluó mediante ensayo con yoduro de propidio.

En este ensayo, se sembraron 150.000 células IMR5 en placas de 24 pocillos durante 24 h a 37°C y a continuación se trataron durante 24 h a 37°C con 40 µg/ml de cada anticuerpo. Después, las células muertas se marcaron con yoduro de propidio (12,5 µg/ml). Todas las muestras se analizaron mediante citometría de flujo en un LSRII FACS (BECTON DICKINSON).

Los resultados se resumen en la siguiente tabla y se ilustran en la figura 12.

	% de células muertas	ETM
PBS	20,2	1,00
c8B6 (301.3)	22,6	1,79
8B6 (301.4)	67,7	1,90
301.14b	46,8	2,61

301.15	48,0	0,77
hulgG1 control	20,2	0,98
mulgG3 control	22,4	1,59

Los resultados confirmaron que las construcciones correspondientes a la fusión de CH1 γ 1 humano (mutado en S133C) y un dominio Bisagra γ 1 humano mutado (mutación subrayada correspondiente a la sustitución de la cisteína 222 por un resto de serina, C222S) (construcción 301.14b) o la fusión de El CH1 γ 3 humano y la Bisagra γ 1 humana (construcción 301.15) tienen actividad pro-apoptótica sobre las células IMR5. Simultáneamente, los resultados confirman que una mutación en la IgG3 8B6 murina para imitar la estructura de IgG1 da como resultado una pérdida de actividad pro-apoptótica.

La reconstitución del emparejamiento entre CH1 y la cadena ligera, típico de los anticuerpos distintos de IgG1, podría restaurar la actividad pro-apoptótica. Tal reconstitución se podría obtener restaurando la cisteína CH1 típica de subclases que no son IgG1 o sustituyendo un dominio CH1 que no es de IgG1.

En conclusión, los autores de la presente invención logran la quimerización del anticuerpo 8B6 con una actividad pro-apoptótica mantenida, cuya actividad pro-apoptótica incluso aumenta para dos anticuerpos, uno de los cuales muestra también una unión cooperativa como anticuerpo original.

2 - Actividad pro-apoptótica del anticuerpo anti-GD2 *in vitro*

La citotoxicidad directa del anticuerpo ch14.18 se evaluó mediante ensayos MTT

En estos ensayos, se incubaron 1×10^4 células IMR5 (100 μ l) en una microplaca de 96 pocillos y se incubaron durante 24 horas a 37°C. Se añadieron anticuerpos de 80 a 0,15 μ g/ml en 50 μ l de medio y se incubaron 24 horas a 37°C. Se añadieron 50 μ g de MTT y se incubaron 4 h a 37°C, las células se solubilizaron y después se realizó la lectura nocturna de la absorbancia a 570 y 650 nm. La absorbancia del producto a 650 nm se restó de la absorbancia a 570 nm (Abs570-Abs650) para calcular la conversión total de colorante. Cuatro pocillos de control con células tratadas con 20 μ g de etopósido proporcionan el blanco para la absorbancia proporcionando 0% de viabilidad. La inhibición de la viabilidad (%) se expresó como porcentaje con respecto a las células no tratadas.

Los resultados, obtenidos con los anticuerpos 311.14b y 311.15, se resumen en las siguientes tablas, en donde el porcentaje de lisis es el obtenido para la concentración de anticuerpos de 80 μ g/ml.

El anticuerpo 311.14b corresponde a un CH1 γ 1 humano mutado (mutación subrayada S133C) con un dominio Bisagra γ 1 humano mutado (mutación subrayada correspondiente a la sustitución de la cisteína 222 por un resto de serina, C222S) como se representa en la figura 3 (SEQ ID NO: 15). Los otros dominios constantes corresponden a los dominios CH2 y CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 9) y el dominio CL kappa (SEQ ID NO: 8).

El anticuerpo 311.15 corresponde a un CH1 γ 3 humano (que reemplaza a su primo CH1 γ 1) con el dominio Bisagra γ 1 humano como se representa en la figura 4 (SEQ ID NO: 16). Los otros dominios constantes corresponden a los dominios CH2 y CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 9) y el dominio CL kappa (SEQ ID NO: 8).

Citotoxicidad directa de los anticuerpos anti-GD2 311.14b y 311.15 sobre células IMR5:

		% lisis max. (80 μ g/ml)	CE ₅₀ (μ g/ml)
IMR5	14.18 (311.4)	57,83	8,37
	311.14b	68,71	9,14
	311.15	64,07	6,34
	ch14.18	8,50	ND

Los resultados muestran que, inesperadamente, los anticuerpos quiméricos que comprenden un CH1 γ 1 δ humano mutado o un CH1 γ 3 humano, tienen una actividad pro-apoptótica, lo que significa que la pérdida de citotoxicidad directa podría deberse a la estructura de IgG1 humana. Por otra parte, todos estos anticuerpos muestran una CE₅₀ similar a la del anticuerpo inicial 14.18.

También se evaluó la citotoxicidad directa de los anticuerpos 311.14b y 311.15 mediante ensayo con yoduro de propidio.

5 En este ensayo, se sembraron 150.000 células IMR5 en placas de 24 pocillos durante 24 h a 37°C y después se trataron durante 24 h a 37°C con 40 µg/ml de cada anticuerpo. Posteriormente, las células muertas se marcaron con yoduro de propidio (12,5 µg/ml). Todas las muestras se analizaron mediante citometría de flujo en un LSRII FACS (Becton Dickinson, San José, CA, EE.UU.).

Los resultados se resumen en la siguiente tabla y se ilustran en la figura 13.

	% de células muertas	ETM
PBS	20,2	1,00
ch14.18 (311.3)	20,4	0,24
14.18 (311.4)	83,8	0,19
311.14b	80,8	1,13
311.15	80,7	0,65
hulgG1 control	20,2	0,98
mulgG3 control	22,4	1,59

10 Los resultados confirmaron que las construcciones correspondientes a la fusión de CH1 y1 humano (mutado en S133C) y un dominio Bisagra y1 humano mutado (mutación subrayada correspondiente a la sustitución de la cisteína 222 por un resto de serina, C222S) (construcción 311.14b) o la fusión de El CH1y3 humano y la Bisagra y1 humana (construcción 311.15) tienen actividad pro-apoptótica sobre las células IMR5.

15 La reconstitución del emparejamiento entre CH1 y la cadena ligera, típico de los anticuerpos distintos de IgG1, podría restaurar la actividad pro-apoptótica. Tal reconstitución se podría obtener restaurando la cisteína CH1 típica de subclases que no son IgG1 o sustituyendo un dominio CH1 que no es de IgG1.

En conclusión, los autores de la presente invención logran la quimerización del anticuerpo 14.18 con una actividad pro-apoptótica mantenida, cuya actividad pro-apoptótica incluso aumenta para dos anticuerpos, uno de los cuales muestra también una unión cooperativa como el anticuerpo original.

3 - Eficacia del anticuerpo anti-OAcGD2 *in vivo*

20 Modelo de neuroblastoma murino

Se adquirieron ratones NOD/SCID, 5 semanas de edad, de Charles River (L'Arbresle, Francia).

25 Los tumores IMR5 de neuroblastoma humano se cultivaron en ratones NOD-SCID inmunodeficientes. A los ratones se les inyectaron por vía subcutánea células tumorales (1×10^6 células IMR5) en el flanco derecho. Se midió el crecimiento tumoral subcutáneo después de la implantación del tumor utilizando la fórmula [Volumen $\text{mm}^3 = (\text{largo}) \times (\text{ancho}^2) \times 0,5$]. En los ratones NOD/SCID portadores de neuroblastoma humano IMR5, el anticuerpo (500 microg/ratón) se administró i.v. cuando el volumen tumoral era igual a $0,1 \text{ cm}^3$.

Los ratones recibieron mAb 8B6 (mulgG3), o mAb c.8B6 (hulgG1), o mAb hulgG1 doblemente mutado, o CH1 hulgG1 sustituido por CH1 hulgG3.

4 - Eficacia del anticuerpo anti-GD2 *in vivo*

30 Modelo de neuroblastoma murino

Se adquirieron ratones NOD/SCID, de 5 semanas de edad, de CHARLES RIVER (L'Arbresle, Francia).

Los tumores IMR5 de neuroblastoma humano se cultivaron en ratones NOD-SCID inmunodeficientes. A los ratones se les inyectaron por vía subcutánea células tumorales (1×10^6 células IMR5) en el flanco derecho. Se midió el crecimiento del tumor subcutáneo después de la implantación del tumor utilizando la fórmula [Volumen $\text{mm}^3 = (\text{largo})$

$\times (\text{ancho}^2) \times 0,5]$. En los ratones NOD/SCID portadores de neuroblastoma humano IMR5, el anticuerpo (500 microg/ratón) se administró i.v. cuando el volumen tumoral era igual a $0,1 \text{ cm}^3$.

Los ratones recibieron mAb 14.18 (hulG3), o mAb ch 14.18 (hulG1), o mAb hulG1 doblemente mutado, o CH1 hulG1 sustituido por CH1 hulG3.

5 **5 - Eficacia del anticuerpo anti-CD20 *in vivo***

Modelo de linfoma murino

Se adquirieron ratones NOD/SCID, 5 semanas de edad, de Charles River (L'Arbresle, Francia).

10 Los tumores Raji del linfoma de Burkitt humano se cultivaron en ratones NOD-SCID inmunodeficientes. A los ratones se les inyectaron por vía subcutánea células tumorales (1×10^7 células Raji) en el flanco derecho. Se midió el crecimiento tumoral subcutáneo después de la implantación del tumor utilizando la fórmula $[\text{Volumen mm}^3 = (\text{largo}) \times (\text{ancho}^2) \times 0,5]$. En los ratones NOD/SCID portadores de linfoma humano Raji, el anticuerpo (500 microg/ratón) se administró i.v. cuando el volumen tumoral era igual a $0,1 \text{ cm}^3$.

Los ratones recibieron mAb chIgG1 rituximab, o mAb chIgG1 doblemente mutado, o mAb chIgG1 con CH1 hulG1 sustituido por CH1 hulG3.

15 **6 - Eficacia del anticuerpo anti-HER2 (Trastuzumab) *in vivo***

Modelo de mama murino

Se adquirieron ratones NOD/SCID, de 5 semanas de edad, de Charles River (L'Arbresle, Francia).

20 Los tumores de mama humana SKBR-3 se cultivaron en ratones NOD-SCID inmunodeficientes. A los ratones se les inyectaron por vía subcutánea células tumorales (2×10^6 células SKBR-3) en el flanco derecho. Se midió el crecimiento del tumor subcutáneo después de la implantación del tumor utilizando la fórmula $[\text{Volumen mm}^3 = (\text{largo}) \times (\text{ancho}^2) \times 0,5]$. En los ratones NOD/SCID que portaban tumor de mama humano SKBR-3, se administró el anticuerpo (500 microg/ratón) i.v. cuando el volumen tumoral era igual a $0,1 \text{ cm}^3$.

Los ratones recibieron mAb IgG1 humanizado con trastuzumab, o mAb IgG1 humanizado doblemente mutado, o mAb IgG1 humanizado con CH1 hulG1 sustituido por CH1 hulG3.

25

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> ATLAB PHARMA
DORVILLIUS, Mylène
TERME, Mickaël
LE DOUSSAL, Jean-Marc

10 <120> ANTICUERPO DERIVADO DE IGG1 HUMANA CON ACTIVIDAD PRO-APOPTÓTICA
<130> ATL-B-0004-PCT
<150> US 61/902,926
<151> 12-11-2013

15 <160> 66
<170> PatentIn versión 3.5

20 <210> 1
<211> 98
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> CH1 gamma1 mutado
<400> 1
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Lys Val

30 <210> 2
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

35 <400> 2
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

ES 2 839 087 T3

						20																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
--	--	--	--	--	--	----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

ES 2 839 087 T3

<400> 6

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys
1 5 10 15

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
20 25 30

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
35 40 45

5

<210> 7

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> dominio visagra mutado

<400> 7

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys
1 5 10 15

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
20 25 30

15

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20

<220>

<223> dominio visagra mutado

<400> 8

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
1 5 10 15

25

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30

<220>

<223> dominio visagra mutado

35

<400> 9

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys

1 5 10 15

Pro

40

<210> 10

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

45

<400> 10

ES 2 839 087 T3

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 11

<211> 217

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

ES 2 839 087 T3

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 12
<211> 219
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> cadena ligera quimerizada

<400> 12
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Lys Asn
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Phe Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Ser Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Leu Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Tyr Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser

ES 2 839 087 T3

	85	90	95
	Thr His Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
	100	105	110
	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu		
	115	120	125
	Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe		
	130	135	140
	Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln		
	145	150	155
	Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser		
	165	170	175
	Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu		
	180	185	190
	Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser		
	195	200	205
	Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
	210	215	
5	<210> 13		
	<211> 449		
	<212> PRT		
	<213> Secuencia Artificial		
10	<220>		
	<223> cadena pesada quimerizada		
	<400> 13		
	Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Pro Gly Asp		
	1	5	10
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Glu Phe Thr Phe Thr Asp Tyr		
	20	25	30
	Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Pro Pro Arg Lys Ala Leu Glu Trp Leu		
	35	40	45
	Gly Phe Ile Arg Asn Arg Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Asn Pro		
	50	55	60
	Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln Ser Ile		
	65	70	75
	Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Thr Glu Asp Ser Ala Thr Tyr		
	85	90	95

Tyr Cys Ala Arg Val Ser Asn Trp Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

ES 2 839 087 T3

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys

<210> 14
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Ab 301.14a

<400> 14
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 115 120

<210> 15
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Ab 301.14b

<400> 15

ES 2 839 087 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
115 120

<210> 16
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Ab 301.15

<400> 16
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
115 120

<210> 17
<211> 168
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Ab 301.16

<400> 17

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Lys Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
100 105 110
Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
115 120 125
Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
130 135 140
Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
145 150 155 160
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
165

5

<210> 18

<211> 168

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Ab 301.17

15 <400> 18

ES 2 839 087 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
100 105 110

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
115 120 125

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
130 135 140

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
145 150 155 160

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
165

<210> 19
<211> 123
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Ab 301.18

<400> 19
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Lys Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
100 105 110
Arg Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
115 120

<210> 20
<211> 123
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Ab 301.19

<400> 20

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
100 105 110

Arg Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro

115 120 - -

<210> 21
<211> 98
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CH1 gamma1 humano silvestre

<400> 21

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val

5

<210> 22

<211> 98

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> CH1 gamma1 humano mutado

<400> 22

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

15

Lys Val

<210> 23

<211> 98

<212> PRT

20

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CH1 gamma2 humano

25

<400> 23

ES 2 839 087 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Thr Val

<210> 24

<211> 98

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CH1 gamma4 humano

<400> 24

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val

<210> 25

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> FR1 HC

<400> 25

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

<210> 26
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR1 HC

<400> 26
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn
1 5

<210> 27
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> FR2 HC

<400> 27
Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10 15

Ala

<210> 28
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR2 HC

<400> 28
Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr
1 5

<210> 29
<211> 38
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> FR3 HC

<400> 29
Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys
1 5 10 15

Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp
20 25 30

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
35

<210> 30
<211> 14

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 5 <220>
 <223> CDR3 HC

 <400> 30
 Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val
 1 5 10

 10 <210> 31
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> FR4 HC

 <400> 31
 Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala
 1 5 10

 20 <210> 32
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 25 <220>
 <223> FR1 LC

 <400> 32
 Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

 30 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala
 20 25

 <210> 33
 <211> 5
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> CDR1 LC

 40 <400> 33
 Ser Ser Val Ser Tyr
 1 5

 <210> 34
 <211> 17
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> FR2 LC

 50 <400> 34
 Ile His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile
 1 5 10 15

 Tyr

 55 <210> 35
 <211> 36
 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> FR3 LC

5

<400> 35

Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15

Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala
20 25 30

Thr Tyr Tyr Cys
35

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> CDR3 LC

15

<400> 36

Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr
1 5

20

<210> 37

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> FR4 LC

<400> 37

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

30

<210> 38

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

35

<220>

<223> CH1 y dominios visagra

<400> 38

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

<210> 39

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> FR1 HC

<400> 39

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 40

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR1 HC

<400> 40

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr
1 5

<210> 41

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> FR2 HC

<400> 41

Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10 15

Arg

<210> 42

<211> 8

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> CDR2 HC

<400> 42
Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr
1 5

10 <210> 43
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> FR3 HC

<400> 43
Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr
1 5 10 15

Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
35

<210> 44
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR3 HC

<400> 44
Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

35 <210> 45
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> FR4 HC

40 <400> 45
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

45 <210> 46
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> FR1 LC

<400> 46

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
20 25

<210> 47
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR1 LC

<400> 47
Gln Asp Val Asn Thr Ala
1 5

<210> 48
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> FR2 LC

<400> 48
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
1 5 10 15

Tyr

<210> 49
<211> 36
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> FR3 LC

<400> 49
Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly
1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
20 25 30

Thr Tyr Tyr Cys
35

<210> 50
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR3 LC

<400> 50
Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
1 5

<210> 51
<211> 10

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 5 <220>
 <223> FR4 LC

 <400> 51
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

 10 <210> 52
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> FR1 HC

 <400> 52
 Glu Val Gln Leu Leu Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

 ser val Met Ile Ser Cys Lys Ala Ser
 20 25

 20 <210> 53
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 25 <220>
 <223> CDR1 HC

 <400> 53
 Gly Ser Ser Phe Thr Gly Tyr Asn
 30 1 5

 <210> 54
 <211> 17
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> FR2 HC

 40 <400> 54
 Met Asn Trp Val Arg Gln Asn Ile Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10 15

 Ala

 <210> 55
 <211> 8
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> CDR2 HC

 50 <400> 55
 Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr
 1 5

 <210> 56
 <211> 38
 55 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> FR3 HC

5

<400> 56

Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys
1 5 10 15

Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met His Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp
20 25 30

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
35

<210> 57

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> CDR3 HC

15

<400> 57

Val Ser Gly Met Glu Tyr
1 5

20

<210> 58

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> FR4 HC

<400> 58

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

30

<210> 59

<211> 26

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

35

<220>

<223> FR1 LC

<400> 59

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Ile Ser Leu Gly
1 5 10 15

40

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
20 25

<210> 60

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

45

<220>

<223> CDR1 LC

50

<400> 60

Gln Ser Leu Val His Arg Asn Gly Asn Thr Tyr Leu
1 5 10

5 <210> 61
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> FR2 LC
 <400> 61
 10 His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile His
 1 5 10 15
 <210> 62
 <211> 36
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> FR3 LC
 20 <400> 62
 Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly
 20 25 30
 Val Tyr Phe Cys
 35
 25 <210> 63
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CDR3 LC
 30 <400> 63
 Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Leu Thr
 1 5 10
 35 <210> 64
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> FR4 LC
 <400> 64
 Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Asn
 1 5 10
 45 <210> 65
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> IgG3 murina y CH1 mutante inverso y secuencia visagra
 <400> 65

ES 2 839 087 T3

Ala Thr Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Val Pro Gly Cys Ser
 1 5 10 15
 Asp Thr Ser Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Lys Trp Asn Tyr Gly Ala Leu Ser Ser
 35 40 45
 Gly Val Arg Thr Val Ser Ser Val Leu Gln Ser Gly Phe Tyr Ser Leu
 50 55 60
 Ser Ser Leu Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val
 65 70 75 80
 Ile Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Lys Thr Glu Leu Ile Lys Arg
 85 90 95
 Ile Glu Pro Arg Ile Pro Lys Pro Cys Thr Pro Pro Gly Ser Ser Cys
 100 105 110

Pro

<210> 66
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Ab 301.15b

<400> 66
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro

REIVINDICACIONES

1. Un método para aumentar la actividad pro-apoptótica de un anticuerpo de inmunoglobulina G de clase 1 (IgG1) quimérico o humanizado que ha perdido su actividad pro-apoptótica en el proceso de quimerización y que se une específicamente a un antígeno de gangliósido con la condición de que dicho gangliósido no corresponda a GD2-O-acetilado, comprendiendo dicho método la etapa de mutar el dominio CH1 γ 1 humano de dicho anticuerpo sustituyendo el aminoácido en la posición 133 o 134, de acuerdo con el índice EU según lo establecido en Kabat *et al.*, del dominio CH1 γ 1 humano de dicho anticuerpo por un resto de cisteína, para restablecer el emparejamiento entre los dominios CH1 y CL que es típico de las subclases IgG2, IgG3 e IgG4 humanas, o sustituyendo el dominio CH1 γ 1 humano de dicho anticuerpo por el dominio CH1 de una IgG2 (CH1 γ 2), IgG3 (CH1 γ 3) o IgG4 (CH1 γ 4) humanas.

2. El método de la reivindicación 1, en donde dicho método comprende la etapa de mutar el dominio CH1 γ 1 humano de dicho anticuerpo sustituyendo el aminoácido en la posición 133 o 134, de acuerdo con el índice EU como se establece en Kabat *et al.*, del dominio CH1 γ 1 humano de dicho anticuerpo por un resto de cisteína, para restaurar el emparejamiento entre los dominios CH1 y CL que es típico de las subclases IgG2, IgG3 e IgG4 humanas.

3. El método de la reivindicación 2, en donde dicha etapa de mutación se refiere a un dominio CH1 γ 1 humano en donde el aminoácido en la posición 133, de acuerdo con el índice EU como se establece en Kabat *et al.*, ha sido sustituido por un resto de cisteína.

4. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa de mutación del dominio CH1 γ 1 humano de dicho anticuerpo sustituyendo el aminoácido en la posición 133 o 134, de acuerdo con el índice EU como se establece en Kabat *et al.*, del dominio CH1 γ 1 humano de dicho anticuerpo por un resto de cisteína, para restablecer el emparejamiento entre los dominios CH1 y CL que es típico de las subclases IgG2, IgG3 e IgG4 humanas, se realiza por medio de:

a) aislamiento de una secuencia de ácido nucleico que comprende el dominio CH1 de un anticuerpo de inmunoglobulina G clase 1 (IgG1) quimérico o humanizado, codificando preferentemente dicha secuencia de ácido nucleico la cadena pesada del anticuerpo;

b) mutación del codón que codifica la posición 133 o 134 de dicho dominio CH1 para codificar el resto de aminoácido cisteína (C) para proporcionar una secuencia de ácido nucleico mutada;

c) aportación a la secuencia de ácido nucleico mutada de elementos de expresión operables;

d) expresión conjunta del ácido nucleico mutado con una secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena ligera del anticuerpo en un anfitrión adecuado, proporcionando así un anticuerpo de inmunoglobulina G clase 1 (IgG1) quimérico o humanizado mutado; y

e) opcionalmente, aislamiento del anticuerpo mutado.

5. El método de la reivindicación 1, en donde dicho método comprende la etapa de sustituir dicho dominio CH1 γ 1 humano por el dominio CH1 de una IgG2 (CH1 γ 2), IgG3 (CH1 γ 3) o IgG4 (CH1 γ 4) humanas.

6. El método de la reivindicación 5, en donde la etapa de sustituir el dominio CH1 γ 1 humano de dicho anticuerpo por el dominio CH1 de una IgG2 (CH1 γ 2), IgG3 (CH1 γ 3) o IgG4 (CH1 γ 4) humanas se realiza por medio de:

a) aislamiento de una secuencia de ácido nucleico que comprende el dominio CH1 de un anticuerpo de inmunoglobulina G clase 1 (IgG1) quimérico o humanizado, codificando preferentemente dicha secuencia de ácido nucleico la cadena pesada del anticuerpo;

b) sustitución de dicha secuencia de ácido nucleico CH1 γ 1 por una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio CH1 de una IgG2 (CH1 γ 2), IgG3 (CH1 γ 3) o IgG4 (CH1 γ 4) humanas para proporcionar una secuencia de ácido nucleico mutada;

c) aportación a la secuencia de ácido nucleico mutada de elementos de expresión operables;

d) expresión conjunta del ácido nucleico mutado con una secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena ligera del anticuerpo en un anfitrión adecuado, proporcionando de ese modo un anticuerpo de inmunoglobulina G clase 1 (IgG1) quimérico o humanizado mutado; y

e) opcionalmente, aislamiento del anticuerpo mutado.

7. El método de la reivindicación 1, en donde dicho método comprende adicionalmente la etapa de mutar el dominio IgG1 de bisagra humana de dicho anticuerpo, para restaurar el emparejamiento entre la bisagra y el dominio CH2 que es típico de las subclases IgG2, IgG3 e IgG4 humanas, o de sustituir dicho dominio bisagra de IgG1 humana por el dominio bisagra de una IgG2, IgG3, IgG4 humana o un dominio bisagra truncado de una IgG3 humana que tiene una secuencia SEQ ID NO: 6, 7, 8 o 9.

8. El método de la reivindicación 7, en donde dicha etapa de mutación del dominio bisagra humano de dicho anticuerpo, para restaurar el emparejamiento entre la bisagra y el dominio CH2 que es típico de las subclases IgG2, IgG3 e IgG4 humanas, se realiza sustituyendo el resto de cisteína en la quinta posición de su secuencia por otro resto, preferiblemente por una serina.

5 9. El método de la reivindicación 8, en donde la etapa de mutación del dominio bisagra humano de dicho anticuerpo, para restaurar el emparejamiento entre el dominio bisagra y CH2 que es típico de las subclases IgG2, IgG3 e IgG4 humanas, se realiza por medio de:

10 a) aislamiento de una secuencia de ácido nucleico que comprende el dominio bisagra de un anticuerpo de inmunoglobulina G clase 1 (IgG1) quimérico o humanizado, codificando preferible dicha secuencia de ácido nucleico la cadena pesada del anticuerpo;

b) mutación del codón que codifica el resto de aminoácido cisteína (C) en la posición 5 de dicho dominio bisagra para codificar otro resto de aminoácido, preferiblemente un resto de serina, para proporcionar una secuencia de ácido nucleico mutada;

c) aportación a la secuencia de ácido nucleico mutada de elementos de expresión operables;

15 d) expresión conjunta del ácido nucleico mutado con una secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena ligera del anticuerpo en un anfitrión adecuado, proporcionando de ese modo un anticuerpo de inmunoglobulina G clase 1 (IgG1) quimérico o humanizado mutado; y

e) opcionalmente, aislamiento del anticuerpo mutado.

20 10. El método de la reivindicación 8, en donde la etapa de sustitución del dominio bisagra de IgG1 humana de dicho anticuerpo, por el dominio bisagra de una IgG2, IgG3, IgG4 humana o un dominio bisagra truncado de una IgG3 humana que tiene una secuencia SEQ ID NO: 6, 7, 8 o 9, se realiza por medio de:

a) aislamiento de una secuencia de ácido nucleico que comprende el dominio bisagra de un anticuerpo de inmunoglobulina G clase 1 (IgG1) quimérico o humanizado, codificando preferiblemente dicha secuencia de ácido nucleico la cadena pesada del anticuerpo;

25 b) sustitución de dicha secuencia de ácido nucleico del dominio bisagra de IgG1 por una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio bisagra de una IgG2, IgG3, IgG4 humana o un dominio bisagra truncado de una IgG3 humana que comprende la secuencia SEQ ID NO: 6, 7, 8 o 9 para proporcionar una secuencia de ácido nucleico mutada;

c) aportación a la secuencia de ácido nucleico mutada de elementos de expresión operables;

30 d) expresión conjunta del ácido nucleico mutado con una secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena ligera del anticuerpo en un anfitrión adecuado, proporcionando de ese modo un anticuerpo de inmunoglobulina G clase 1 (IgG1) quimérico o humanizado mutado; y

e) opcionalmente, aislamiento del anticuerpo mutado.

35 11. Una composición que comprende al menos un anticuerpo obtenido mediante el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, y un portador farmacéuticamente aceptable.

12. La composición de la reivindicación 11, para su uso en un método para el tratamiento del cáncer.

ASTKGPSVFP LAPCSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCP APELLGGP

Figura 2

ASTKGPSVFP LAPCSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKV EPKSDKTHTCPPC PAPELLGGP

Figura 3

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YTCNVNHKPS NTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCP APELLGGP

Figura 4

ASTKGPSVFP LAPCSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKV ELKTPLGDTTHT CPRCP
EPKSCDTFPFCPRCP EPKSCDTFPFCPRCP EPKSCDTFPFCPRCP APELLGGP

Figura 5

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YTCNVNHKPS NTKVDKRV ELKTPLGDTTHT
CPRCP EPKSCDTPPPCPRCP EPKSCDTPPPCPRCP EPKSCDTPPPCPRCP APELLGGP

Figura 6

ASTKGPSVFP LAPCSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKV ELKTPLGDTTHT CPRCP
APELLGGP

Figura 7

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YTCNVNHKPS NTKVDKRV ELKTPLGDTTHT CPRCP
APELLGGP

Figura 8

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSG GTAAAGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YTCNVNHKPS NTKVDKRV EPKSSDKTHT CPPCP

Figura 9

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT
VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTV EPKSCDKTHT CPPCP

Figura 10

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT
VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRV EPKSCDKTHT CPPCP

Figura 11

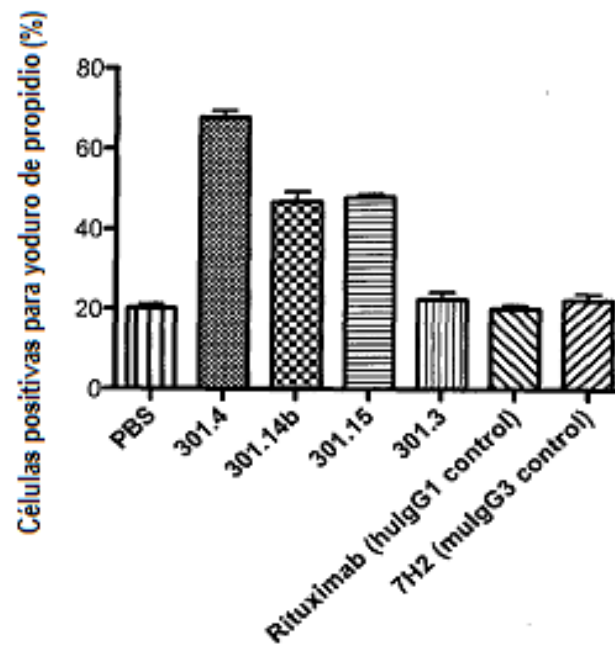


Figura 12

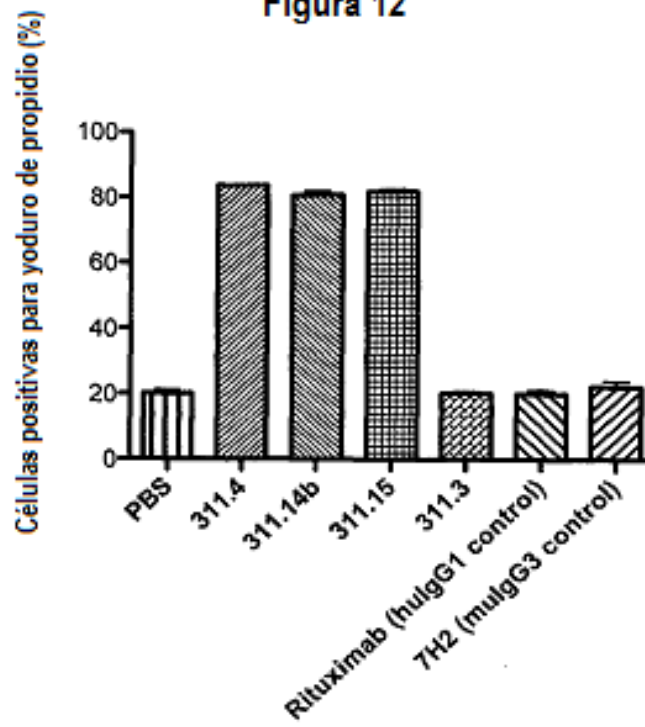


Figura 13